

A 9161  
06/00  
EDV-L

# Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)-40-6562051 Fax: -6567919

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000

Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

12. Dezember 2000

Uns. Zeichen: 02816

Eppendorf AG

---

Labortemperiereinrichtung zur Temperierung auf unterschiedliche Temperaturen

---

Die Erfindung betrifft eine Labortemperiereinrichtung der im Oberbegriff des Anspruches 1 bzw. des Anspruches 11 genannten Art.

Derartige Einrichtungen werden zum Temperieren von Reaktionsproben verwendet, die in Schritten einer Schrittfolge auf Temperaturen in unterschiedlichen Temperaturbereichen gebracht werden. Die Schrittfolge wird in einem Durchlauf zyklisch wiederholt. Solche Einrichtungen eignen sich zur Durchführung spezieller chemischer Reaktionen, insbesondere von Enzymreaktionen. Das Hauptanwendungsgebiet ist die PCR (Polymerase Chain Reaction). Dabei werden in dem üblichen dreischrittigen Verfahren der Denaturierungsschritt bei zirka 90°C, der Annealingschritt bei zirka 50°C und der Elongationsschritt bei zirka 60°C durchlaufen.

Ein Problem ist dabei, insbesondere beim Annealingschritt, aber auch bei den anderen Schritten stets die Ermittlung der optimalen Temperatur. Dazu werden Versuche bei unterschiedlichen Temperaturen benötigt.

Um diese Versuche zur Auffindung der optimalen Temperatur eines Schrittes zu vereinfachen, wurden die gattungsgemäßen Labortemperiereinrichtungen entwickelt, wie sie z. B. in US 6 054 263 sowie in DE 196 46 115 A1 beschrieben sind.

Beim gattungsgemäßen Stand der Technik wird in einem der Schritte, zumeist im Annealingschritt mit unterschiedlichen Temperaturen gearbeitet. Bei den anderen Schritten werden gleiche Temperaturen verwendet. Die Reaktionsproben sind nach dem Stand der Technik in einem Flächenarray in Reihen und Spalten angeordnet. In dem Schritt, der unterschiedliche Temperaturen verwendet, wird in einer Richtung des Arrays, also beispielsweise in Richtung der Zeilen ein Temperaturgradient angelegt. Dies führt dazu, dass erste Gruppen von Proben von den Spalten gebildet werden, wobei innerhalb der Spalten gleiche Temperaturen, zwischen den Spalten jedoch unterschiedliche Temperaturen anliegen.

Bei der Auswertung der Proben nach abgeschlossenem Temperierungsdurchlauf kann ermittelt werden, in welcher der Spalten das optimale Ergebnis vorliegt. Die zugehörige Temperatur ist dann die optimale Temperatur dieses Schrittes, z. B. des Annealingschritt.

Wird der Temperaturgradient auf den Annealingschritt angewendet und liegt bei diesem der Temperaturbereich z.B. bei 50°-60°C, so kann man z. B. in zehn Spalten die Temperaturen je ein Grad unterschiedlich anlegen und somit die optimale Temperatur ermitteln.

Will man auch bei den anderen Schritten der Schrittfolge die Temperaturen optimieren, so muß derselbe Durchlauf wiederholt werden, wobei nun aber der Gradient in einem anderen der Schritte angelegt wird. Will man bei dem üblichen dreischrittigen PCR-Verfahren alle drei Schritte optimieren, so müssen drei kom-

plette Temperierdurchläufe nacheinander durchgeführt werden. Dazu ist ein erheblicher Zeitaufwand von zirka 1,5 h pro Durchlauf und ein erheblicher Verbrauch an zum Teil extrem teuren Proben erforderlich. Da die optimalen Temperaturen der einzelnen Schritte in unterschiedlichen Durchläufen ermittelt werden, werden eventuelle Wechselwirkungen zwischen den Temperaturen der Schritte nicht berücksichtigt. Dies kann zur Ermittlung nichtoptimaler Temperaturen führen.

In der DE 196 46 115 A1 ist zu Fig. 5 eine zu Anspruch 11 gattungsgemäße Labortemperiereinrichtung beschrieben, die bei zwei Schritten der Schrittfolge Gradienten in unterschiedlichen Richtungen (X, Y) an das Array der Reaktionsproben anlegt. Damit ist es möglich, in nur einem Durchlauf in zwei Temperaturbereichen die optimale Temperatur zu ermitteln.

Auch bei der letztgenannten Einrichtung ist ein weiterer Durchlauf zur Optimierung der dritten Temperatur erforderlich. Bei einer flächigen Arrayanordnung von Reaktionsproben stehen aber nur zwei Richtungen X und Y zur Verfügung. Für eine dritte Temperatur wäre eine dritte Richtung Z erforderlich, die bei einer zweidimensionalen Anordnung nicht vorhanden ist.

Dabei wurde es nach dem Stand der Technik für unabdingbar erforderlich gehalten, Gradienten bei unterschiedlichen Schritten in unterschiedlichen Richtungen anzulegen, also z. B. beim einen Schritt in Richtung der Spalten und beim anderen Schritt in Richtung der Zeilen, um bei der Ermittlung der Reaktionsergebnisse, die sich ergebenden Unterschiede eindeutig den Temperaturvariationen im einen Schritt und im andern Schritt zuordnen zu können.

Das Hauptanwendungsgebiet der gattungsgemäßen Labortemperiereinrichtungen liegt auf dem Gebiet der PCR. Diese verwendet üblicherweise drei Schritte. Es

wäre sehr vorteilhaft, alle drei Schritte auf einfache Weise in einem einzigen Temperierdurchlauf optimieren zu können. Es sind auch Prozesse mit mehr als drei Schritten bekannt, bei denen dieselben Probleme bestehen. Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Labortemperiereinrichtung zu schaffen, die den Arbeits- und Geräteaufwand bei der Ermittlung der optimalen Temperaturen aller Schritte der Schrittfolge verringert.

Diese Aufgabe wird mit den Merkmalen des Anspruches 1 sowie des Anspruches 11 gelöst.

Bei der Lösung des Anspruches 1 geht die Erfindung von der Erkenntnis aus, daß bei den meisten auf gattungsgemäßen Labortemperiereinrichtungen durchführbaren Prozessen und insbesondere bei dem üblichen dreischrittigen PCR-Prozess die Temperaturänderungen bei den einzelnen Schritten nicht immer denselben Auswertparameter beeinflussen. Bei dem üblichen PCR-Prozess beeinflussen Temperaturänderungen beim Annealingschritt und beim Elongationsschritt im wesentlichen denselben Parameter, nämlich die Spezifität, also das Verhältnis von korrekt amplifizierten DNA-Strängen der richtigen Länge zu falsch amplifizierten Strängen abweichender Länge. Temperaturänderungen beim Denaturierungsschritt beeinflussen aber im wesentlichen einen anderen Parameter nämlich die Ausbeute, also die Menge gewonnenen amplifizierten DNA-Materiales. Diese beiden Parameter sind voneinander unabhängig am Reaktionsprodukt bestimmbar. Wenn man beim einfachen Beispiel einer Temperiereinrichtung mit flächig in Zeilen und Spalten angeordneten Reaktionsproben bleibt, legt die Labortemperiereinrichtung also bei zwei Schritten, die denselben Parameter beeinflussen (z.B. Annealingschritt und Elongationsschritt), die Gradienten in unterschiedlichen Richtungen an und bei zwei Schritten (z.B. Annealingschritt und Denaturierungsschritt), die unterschiedliche Parameter beeinflussen, Gradienten in beliebiger Richtung an. Im letztgenannten Fall können die Temperaturgradienten sogar

in beiden Schritten derselben Richtungen angelegt werden. Da hierbei die Auswertparameter bei den beiden Schritten unterschiedlich sind und unabhängig bestimmbar sind, können die optimalen Temperaturen für beide Schritte getrennt ermittelt werden. Es ergibt sich der enorme Vorteil, daß bei der mit Gradienten in X- und Y-Richtung arbeitenden Konstruktion der DE 196 46 115 A1 entgegen der bisherigen Erwartungen der Fachwelt doch alle drei Schritte des Standard PCR-Prozesses in einem Temperierdurchlauf optimiert werden können. Da die Temperaturen mehrerer Schritte in einem gemeinsamen Durchlauf ermittelt werden, werden auch Wechselwirkungen zwischen den Schritten (Crosstalk) berücksichtigt, was z.B. bei Annealingschritt und Elongationsschritt der Fall ist.

Die Erfindung ist nicht auf zweidimensionale Array-Anordnungen der Reaktionsproben in Zeilen- und Spaltenausrichtung beschränkt. Die Reaktionsproben können auch in einer dreidimensionalen Anordnung vorgesehen sein. Dann lassen sich drei Schritte in unterschiedlichen Gradientenrichtungen optimieren. Die Erfindung gibt dann den Vorteil, auch bei mehr als dreischrittigen Schrittfolgen, sofern bei wenigsten einem der Schritte ein unabhängiger Parameter beeinflußt wird, alle Schritte in einem Durchlauf optimieren zu können.

Bei der Optimierung eines Reaktionsprozesses, wie z.B. des PCR-Prozesses, kommt es nicht allein auf die Temperaturoptimierung bei den einzelnen Schritten an, sondern es kann auch erforderlich sein, die Reaktionsproben hinsichtlich anderer Parameter z.B. hinsichtlich der Verdünnung zu optimieren. Der Vorteil der Erfindung, Temperaturoptimierungen in mehr Schritten durchführen zu können als unabhängige Richtungen in der Probenanordnung vorhanden sind, bietet auch hierfür eine Lösung. In einer 3-dimensionalen Anordnung können z.B. mehrere Flächen in Ebenen übereinander gelegt werden, in denen Proben unterschiedlicher Verdünnung angeordnet sind. Da sich die Verdünnung auf dieselben Auswertparameter auswirken kann, ist es vorteilhaft, die Richtung, in der unter-

schiedliche Verdünnungen vorliegen, nicht zum Anlegen unterschiedlicher Temperaturen zu verwenden. Daher werden die Temperaturgradienten in den Ebenen angelegt. Es können also in einem Durchlauf alle drei Schritte des PCR-Prozesses hinsichtlich der Temperaturen und auch der Verdünnung optimiert werden.

Die Erfindung ist auch nicht beschränkt auf die übliche Anordnung der Reaktionsproben in einem wärmeleitenden Temperierblock, der z.B. an gegenüberliegenden Enden beheizt und gekühlt wird und auf diese Weise über den Block hinweg einen Temperaturgradienten erzeugt. Bei Verwendung von Einzeltemperiereinrichtungen für alle Reaktionsproben sind beliebige, auch zufällige Anordnungen der Reaktionsproben und der einzelnen Gradienten möglich. Es sind dann im ersten Schritt erste Gruppen von Reaktionsproben entsprechend zu temperieren und im zweiten Schritt zweite Gruppen von Reaktionsproben entsprechend der Vorschrift des Anspruch 1 zu temperieren. Diese Gruppen können bei beliebiger Anordnung der Reaktionsproben und/oder der Temperaturschritte zufällig über die Probenanordnung verteilt sein. Bei heutiger Computertechnik stellt die sich ergebende komplizierte Verknüpfung der Proben zu ersten und zweiten Gruppen kein Problem dar.

Sind die Auswertparameter zumindest weitgehend voneinander unabhängig, was wie erwähnt beim üblichen PCR-Prozeß z. B. bei dem Annealingschritt und dem Denaturierungsschritt der Fall ist, dann können, wie bereits erwähnt, die Proben der dritten Gruppen völlig beliebig gewählt werden, weil auf die Gruppenzusammenstellung bei den anderen Schritten wegen der unabhängigen Parameterauswertung keine Rücksicht genommen werden muß.

Vorteilhaft sind dann die Merkmale des Anspruches 2 vorgesehen. Hierbei können für die dritte Gruppenbildung das Schema der Gruppenbildung für die ersten Gruppen verwendet werden. Das vereinfacht die Temperiereinrichtung erheblich.

Bei dem bereits erwähnten Standardanwendungsfall einer flächigen Arrayanordnung in Zeilen und Spalten können also z. B. die ersten Gruppen aus Zeilen bestehen und die dritten wiederum ebenfalls aus Zeilen. Es kann also für den zweiten Schritt die Ansteuerungsgeometrie des ersten Schrittes übernommen werden. Wird mit einem Temperaturgradienten in einem wärmeleitfähigem Block gearbeitet, so kann die Richtung des Gradienten des zweiten Schrittes mit der des Gradienten des ersten Schrittes parallel oder antiparallel zusammenfallen. Unter anderem bedeutet dies, daß bei einer einfachen Labortemperiereinrichtung, die einen Gradienten in nur einer Richtung erzeugen kann, dennoch bei einem zweischrittigen Verfahren beide Schritte optimiert werden können, sofern bei diesen beiden Schritten die Auswertparameter unterschiedlich sind.

Nach der Erfindung ist es ganz allgemein nur erforderlich, daß bei mindestens einer der ersten Gruppen wenigstens zwei der Proben verschiedenen zweiten Gruppen angehören. Damit lassen sich sehr einfache grob gerasterte Optimierungen durchführen, die z. B. nur zwei unterschiedliche Temperaturen pro Schritt untersuchen. Vorteilhaft sind jedoch die Merkmale des Anspruches 3 vorgesehen, wonach z. B. auch bei größeren Gruppen jeweils alle Proben der zweiten Gruppen zu unterschiedlichen ersten Gruppen gehören. Bei einem flächigen Array mit Zeilen und Spalten würde dies bedeuten, daß z. B. im ersten Schritt die Temperaturen zwischen den Spalten unterschiedlich sind und im zweiten Schritt zwischen den Zeilen unterschiedlich sind, also alle Proben einer Spalte in unterschiedlichen Zeilen (zweiten Gruppen) liegen.

Wie bereits erwähnt, läßt sich die Erfindung auch mit sehr komplexer Anordnung der Reaktionsproben ausführen. Vorteilhaft sind jedoch die Merkmale des Anspruches 4 vorgesehen. Dies erlaubt die Ausbildung der erfindungsgemäßen Labortemperiereinrichtung in üblicher Standardbauweise, wie z. B. aus einer der eingangs genannten Schriften bekannt. Vorteilhaft sind dabei auch die Merkmale



des Anspruches 5 vorgesehen, wird also die übliche übersichtliche orthogonale Anordnung verwendet, die den Vorteil hat, daß von den orthogonalen Kanten eines Blockes her Gradienten in Zeilen- und Spaltenrichtung erzeugt werden können. Dann sind vorteilhaft die Gruppen gemäß Anspruch 6 den Zeilen und Spalten zugeordnet.

Gattungsgemäße Labortemperiereinrichtungen dienen nicht nur der Optimierung der Temperaturen der einzelnen Schritte, sondern sind insbesondere auch nach Ermittlung der optimalen Temperaturen zur Massenverarbeitung von Proben vorgesehen. Sie nehmen daher eine sehr große Zahl von Reaktionsproben auf, z. B. 384 Proben in 24 Spalten und 16 Zeilen.

Dabei sind vorteilhaft die Merkmale des Anspruches 7 vorgesehen. Wenn hiernach z. B. nur eine der ersten Gruppen mehrere Proben enthält, und auch nur eine der zweiten Gruppen mehrere Proben enthält, ergibt sich im Falle der Anordnung in einem zweidimensionalen Array mit Zeilen und Spalten z. B. nur bei einer Zeile und nur einer Spalte eine vollständige Besetzung mit Proben, also pro Richtung nur eine besetzte Reihe. Werden bei den Schritten Gradienten in Zeilen- und Spaltenrichtung angelegt, so kann die Temperaturoptimierung mit sehr wenigen Proben, also mit sehr sparsamem Verbrauch der teuren Proben erfolgen. Dabei kann die Labortemperiereinrichtung durchaus zur Aufnahme einer sehr großen Probenzahl, z. B. 384 Proben ausgebildet sein. Die übrigen Probenplätze bleiben unbesetzt. Es kann jedoch auch ein Spezialgerät verwendet werden, das nur eine Probenspalte und ein Probenzeile aufweist und das speziell nur zur Optimierung vorgesehen ist und nicht für den Massendurchsatz. Selbstverständlich können pro Richtung auch mehr als eine besetzte Reihe verwendet werden, z.B. zwei parallele Reihen direkt nebeneinander oder auch im Abstand.

Dabei sind vorteilhaft die Merkmale des Anspruches 8 vorgesehen. Durch dieses Merkmal ist sichergestellt, daß jede Gruppe bei Schritten, bei denen ihre Proben auf gleicher Temperatur liegen, im mittleren Bereich des zugeordneten Temperaturbereiches liegen. Es wird also z.B. beim Annealingschritt mit unterschiedlichen Temperaturen nach der optimalen Temperatur gesucht. Bei den anderen Schritten werden aber die mittleren Temperaturen des Temperaturbereiches verwendet, um aussagekräftige Ergebnisse zu gewährleisten.

Wenn bei zwei Schritten unterschiedliche Auswertparameter beeinflußt werden, die ausgewerteten Ergebnisse also unabhängig sind, so können die dritten Gruppen beliebig gewählt werden. Sie können auch gemäß Anspruch 2 mit den ersten Gruppen zusammenfallen. Vorteilhaft können Sie auch gemäß Anspruch 9 gewählt werden. Danach sind die dritten Gruppen bei einer zweidimensionalen Array Anordnung der Reaktionsproben in zusammenhängende Flächen unterteilt, die nur mit jeweils Proben einer Gruppe besetzt sind. Dies ermöglicht eine besonders einfache Auswertung. Bei einer Anordnung der Proben in der Temperiereinrichtung in Zeilen und Spalten können die dritten Gruppen also abweichend von den Zeilen und Spalten in Flächen, z. B. in vier Sektoren, angeordnet sein, vorausgesetzt, daß die Temperiereinrichtung ihrer Bauart nach dies zuläßt. Bei Einzeltemperierung der Reaktionsproben können die den dritten Gruppen zugeordneten Flächen beliebig gewählt werden. Man kann beispielsweise aus thermischen Gründen wärmere Gruppen in das Innere des Arrays und kältere Gruppen zum Rand hin legen.

Die Erfindung kann bei mehrschrittigen Schrittfolgen nur auf wenige der Schritte, z. B. auf zwei von drei Schritten angewendet werden, wobei dann der dritte Schritt ohne Temperaturoptimierung mit gleicher Temperatur aller Reaktionsproben durchgeführt wird. Vorteilhaft sind jedoch die Merkmale des Anspruches 10

vorgesehen. Wie bereits erwähnt stellt die Temperaturoptimierung bei allen Schritten eines Prozesses einen erheblichen Vorteil dar.

Bei der Erfindung gemäß Anspruch 11 werden Reaktionsproben ersten, zweiten und dritten Gruppen zugeordnet, die jeweils für einen der Schritte in dem zugehörigen Temperaturbereich zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen, innerhalb der Gruppen jedoch gleiche Temperaturen aufweisen. Hiermit kann bei jedem Schritt in unterschiedlicher Gruppeneinteilung mit unterschiedlichen Temperaturen gearbeitet werden. In einem Durchlauf können somit bei allen drei Schritten des üblichen PCR-Prozesses die optimalen Temperaturen ermittelt werden.

Die Proben können 3-dimensional angeordnet sein, wodurch sich drei Dimensionen, also bei regelmäßiger Anordnung z.B. Spalten, Zeilen und Ebenen ausbilden, nach denen in übersichtlicher Weise gruppiert werden kann. Wie bereits oben zu Anspruch 1 erwähnt, sind auch unregelmäßige 3-dimensionale Anordnungen mit entsprechend komplizierterer Gruppenunterteilung möglich, wenn Einzelheizungen der Reaktionsproben vorgesehen sind.

Vorteilhaft sind die Merkmale des Anspruches 12 vorgesehen. Bei dieser sehr einfachen Anordnung mit Temperaturgradienten in X-, Y- und Z-Richtung kann in einem üblichen wärmeleitenden Block gearbeitet werden, in dem die Reaktionsproben angeordnet sind. Gegenüber der bekannten Anordnung muß hier allerdings der Temperierblock 3-dimensional und beheizbar ausgebildet sein.

Vorteilhaft sind auch die Merkmale des Anspruches 13, wonach die Reaktionsproben in einer Fläche angeordnet sind. Es können beispielsweise Teilflächen, die die übliche X-Y-Anordnung von Proben aufweisen und die den Ebenen einer 3-dimensionalen Anordnung entsprechen, zu mehreren z.B. nebeneinander in

einer Fläche angeordnet sein. In dem die Labortemperiereinrichtung steuernden Computer kann zu Darstellungszwecken die etwas unübersichtliche 2-dimensionale Anordnung in die mit drei Koordinaten wohlgeordnete 3-dimensionale Anordnung umgerechnet werden.

Vorteilhaft sind die Merkmale des Anspruches 14 vorgesehen. In zwei Schritten werden jeweils in Teilflächen Gradienten entgegengesetzter Richtung angelegt, wobei sich die Teilflächen der beiden Schritte in Quadranten überlappen. Im dritten Schritt werden die gebildeten Quadranten auf unterschiedliche Temperaturen gebracht. Auf diese Weise ist es ebenfalls sehr einfach möglich, in einer flächigen Anordnung von Reaktionsproben in drei Schritten die Temperatur für alle Schritte in einem Durchgang zu optimieren.

Die Merkmale der Ansprüche 1 bis 10 sowie 11 bis 14 können in vorteilhafter Weise auch kombiniert werden.

In den Zeichnungen ist die Erfindung beispielsweise und schematisch dargestellt. Es zeigen:

Fig. 1 eine stark schematisierte erfindungsgemäße Labortemperiereinrichtung in Draufsicht auf ein nach Zeilen und Spalten geordnetes zweidimensionales Array von Reaktionsproben mit einem in X-Richtung angelegten Temperaturgradienten für den Annealingschritt eines Standard PCR-Prozesses,

Fig. 2 die Ansicht nach Fig. 1 für den Elongationsschritt mit einem Temperaturgradient in Y-Richtung,

- Fig. 3 eine Ansicht nach Fig. 1 für den Denaturierungsschritt mit einem Temperaturgradienten ebenfalls in Y-Richtung,
- Fig. 4 eine Ansicht nach Fig. 1 für den Denaturierungsschritt mit einer Aufteilung des Arrays in drei flächig gestaltete Gruppen,
- Fig. 5 die schematische Darstellung eines nach Zeilen und Spalten geordneten Arrays von Reaktionsproben, die ersten Gruppen (Zahlen) und zweiten Gruppen (Buchstaben) zugeordnet sind,
- Fig. 6 eine Darstellung entsprechend Fig. 5 mit anderer Anordnung der Reaktionsproben,
- Fig. 7 eine stark schematisierte erfindungsgemäße Labortemperiereinrichtung mit 3-dimensionaler Anordnung von Reaktionsproben, wobei drei Ebenen der 3-dimensionalen Anordnung in der Figur übereinander dargestellt sind,
- Fig. 8 die Darstellung einer Anordnung der Proben der Ausführungsform der Figur 7 in einem Flächenarray und
- Fig. 9-11 zeigen eine weitere Ausführungsform der Labortemperiereinrichtung mit den jeweils eingestellten Temperaturen bei drei Schritten.

Fig. 1 zeigt eine Draufsicht auf ein Array von insgesamt 35 Reaktionsproben 1, die in einem zweidimensionalen Array in orthogonalen Zeilen und Spalten angeordnet sind. Das Feld ist mit einem gestrichelt dargestellten Rand 2 umgrenzt. Es kann sich beispielsweise um einen üblichen, mit dem Rand 2 begrenzten Temperierblock 3 handeln, wie er z. B. in der DE 196 46 115 A1 zu Fig. 5 erläutert ist,

mit der Möglichkeit, in Richtung der Zeilen oder in Richtung der Spalten einen Temperaturgradienten anzulegen. Zu den technischen Einzelheiten dazu wird auf die genannte Schrift ausdrücklich Bezug genommen.

In Fig. 1 ist die dargestellte Labortemperiereinrichtung zur Ausführung des Annealingschrittes des Standard PCR-Prozesses betrieben. Es ist in X-Richtung der mit in Zeilenrichtung laufendem Pfeil dargestellte Temperaturgradient angelegt, der dafür sorgt, daß alle Reaktionsproben 1 der ersten Spalte auf  $40^{\circ}$  liegen, alle Proben der letzten Spalte auf  $60^{\circ}$  und die der mittleren Spalte auf  $50^{\circ}$ . Die übrigen Spalten weisen dazwischen liegende Temperaturen auf.

Die dargestellten Reaktionsproben 1 sind somit in ersten Gruppen unterschiedlich temperiert, wobei die ersten Gruppen den Spalten der dargestellten Anordnung entsprechen. Innerhalb jeder ersten Gruppe (Spalte) weisen alle Reaktionsproben 1 gleiche Temperatur auf, zwischen den Spalten herrschen unterschiedliche Temperaturen.

Fig. 2 zeigt die Temperiereinrichtung der Fig. 1 beim Elongationsschritt. Hier ist mit geeigneten, nicht dargestellten Einrichtungen ein Temperaturgradient im Sinne des dargestellten Pfeiles in Y-Richtung angelegt. Die unterste Zeile liegt auf  $70^{\circ}$ , die oberste Zeile auf  $76^{\circ}$ . Die Zwischenzeilen haben entsprechende Zwischentemperaturen. Hier sind also die Reaktionsproben in zweiten Gruppen auf unterschiedlichen Temperaturen gehalten, wobei die zweiten Gruppen den Zeilen entsprechen. Aus Vergleich der Figuren 1 und 2 ist ersichtlich, daß bei den beiden in Fig. 1 und 2 dargestellten Schritten jeweils alle Proben einer ersten Gruppe (Spalte) unterschiedlichen zweiten Gruppen (Zeilen) angehören und umgekehrt. In der flächigen Darstellung bedeutet dies, daß die Gruppen und ebenso die Temperaturgradienten orthogonal zueinander stehen.

Fig. 3 zeigt dieselbe Temperiereinrichtung bei der Ausführung eines dritten Schrittes, nämlich des Denaturierungsschrittes. Auch dieser Schritt soll auf die günstigste Temperatur optimiert werden und zwar in einem Temperaturbereich, der im dargestellten Beispiel bei  $90^{\circ}$ - $96^{\circ}$  liegt. Der Temperaturgradient wird hier in Y-Richtung angelegt.

Die drei Schritte Annealing, Elongation und Denaturierung bilden eine Schrittfolge, die mehrfach wiederholt wird zur exponentiellen Amplifizierung.

Wie die Figuren 1-3 zeigen, wird bei allen Schritten in dem jeweils dem Schritt zugeordneten Temperaturbereich die Temperatur variiert. Gemäß Fig. 1 sind unterschiedliche erste Gruppen (Spalten) auf unterschiedlichen Temperaturen zwischen  $40^{\circ}$ - $60^{\circ}$  gehalten. Gemäß Fig. 2 sind zweite Gruppen (Zeilen) auf unterschiedlichen Temperaturen im Temperaturbereich zwischen  $70^{\circ}$ - $76^{\circ}$  gehalten. Gemäß Fig. 3, beim Denaturierungsschritt, sind unterschiedliche dritte Gruppen (wiederum Zeilen) auf unterschiedlichen Temperaturen zwischen  $90^{\circ}$ - $96^{\circ}$  gehalten. Bei allen drei Schritten werden unterschiedliche Temperaturen angelegt. Durch Auswertung des Reaktionsergebnisses nach abgeschlossenem Durchlauf kann ermittelt werden, welche Temperatur in welchem Schritt optimal ist. Das Reaktionsergebnis kann auch während des Durchlaufes laufend verfolgt werden (Onlinemonitoring).

Diese Auswertung stellt bei den beiden Schritten gemäß Fig. 1 und Fig. 2 kein Problem dar, da die Gradienten in X- und Y-Richtung, also orthogonal zueinander stehen. Man braucht nur auszuwerten in welcher Reaktionsprobe das beste Ergebnis vorliegt und kann dann nach Zeile und Spalte ersehen, welches die beste Annealingtemperatur (Fig. 1) und welches die beste Elongationstemperatur (Fig. 2) ist. Bei dem Denaturierungsschritt gemäß Fig. 3 fallen die dort unterschiedlich temperierten dritten Gruppen mit den in Fig. 2 unterschiedlich tempe-

rierten zweiten Gruppen zusammen. Bei beiden Gruppen handelt es sich um Zeilen.

Unterschiedliche Annealingtemperaturen beeinflussen im wesentlichen die Spezifität des Reaktionsergebnisses. Mit Spezifität wird das Verhältnis der korrekt amplifizierten DNA-Stücke mit korrekter Länge zu nicht korrekt amplifizierten DNA-Stücken abweichender Länge bezeichnet. Die Elongationstemperatur beeinflusst im wesentlichen denselben Auswertparameter, nämlich die Spezifität. Die Denaturierungstemperatur im Schritt gemäß Fig. 3 beeinflusst jedoch im wesentlichen die Ausbeute, also die Menge des erhaltenen Reaktionsmaterials.

Die Temperiereinrichtung ist daher so ausgebildet, daß sie bei den beiden Schritten Annealing (Fig. 1) und Elongation (Fig. 2), die den selben Auswertparameter beeinflussen, die Temperaturgradienten in unabhängiger Richtung X und Y anlegt. Bei dem Schritt gemäß Fig. 3 (Denaturierung), der einen abweichenden Auswertparameter nämlich die Ausbeute beeinflusst, kann der Temperaturgradient in beliebiger Richtung gelegt werden. In dem in Fig. 3 dargestellten Ausführungsfall liegt er in Y-Richtung. Er kann jedoch auch in X-Richtung liegen.

Fig. 4 zeigt in einer Ausführungsvariante die Einrichtung der Fig. 1-3 beim Denaturierungsschritt, also im Temperaturbereich zwischen  $90^{\circ}$ - $96^{\circ}$ . Die dritten Gruppen unterschiedlicher Temperatur sind hier jedoch nicht zeilenweise oder spaltenweise angeordnet, sondern in Form der drei dargestellten Flächenbereiche, die auf den drei Temperaturen  $90^{\circ}$ ,  $93^{\circ}$  und  $96^{\circ}$  liegen. Die Flächenbereiche sind durch die dargestellten Bereichsgrenzen unterteilt.

Die Ausführungsform der Fig. 4 setzt eine etwas andere Konstruktion voraus. Ein gut wärmeleitender Block, der sich zur Anlegung von Temperaturgradienten in X- und Y-Richtung eignet, wie er für die Ausführungsform der Figuren 1-3 ver-



wendbar ist, wäre zur Ausbildung gut abgegrenzter in sich gleichmäßig temperierter Flächen gemäß Fig. 4 nur schlecht geeignet. Sonderkonstruktionen können dies jedoch leisten, insbesondere Einrichtungen mit individueller Temperierung der einzelnen Reaktionsproben 1. Eine solche Konstruktion der Labortemperiereinrichtung kann dann selbstverständlich auch die in den Figuren 1-3 dargestellten Temperaturgradienten erzeugen.

Die Erfindung ist nicht beschränkt auf die in den Figuren 1-4 dargestellte Ausführungsform.

Fig. 5 zeigt noch einmal stark schematisiert eine flächige Arrayanordnung von Reaktionsproben, die in Zeilen und Spalten angeordnet sind. Jede Reaktionsprobe ist mit einer Zahl/Buchstabe-Kombination dargestellt. Dabei bedeuten die Zahlen die Spalten und die Buchstaben die Zeilen. Eine Reaktionsprobe in der zweiten Zeile und in der dritten Spalte ist also mit 3b dargestellt.

Fig. 6 zeigt dieselben Reaktionsproben, die in Fig. 5 dargestellt sind, jedoch in einer anderen, z.B., zufälligen Anordnung. Auch mit einer solchen Anordnung, die allerdings Einzeltemperierung der Reaktionsproben voraussetzt, kann eine Labortemperiereinrichtung erfindungsgemäß arbeiten. Sie muß z. B. mit Computerunterstützung erste Gruppen (z. B. die Zahlen 1-4) ermitteln und bei einem ersten Schritt unterschiedlich aber in sich gleich temperieren und sie muß in einem zweiten Schritt zweite Gruppen (Buchstaben) gruppenweise unterschiedlich aber mit in sich gleichen Temperaturen temperieren. Wenn bei den beiden Schritten die Auswertparameter unterschiedlich sind, kann sie in den beiden Schritten beliebige Gruppen bilden und entsprechend temperieren.

In den dargestellten Ausführungsformen sind die Reaktionsproben in flächigen Arrays in Zeilen- und Spaltenanordnung sortiert. Dies erleichtert insbesondere

die Verwendung herkömmlicher Temperierblocks, die nur zur Ausbildung von Temperaturgradienten in orthogonaler Richtung und zwar in Richtung der Spalten bzw. Zeilen geeignet sind. Bei anderer Ausbildung der Einrichtung, insbesondere, wenn diese mit Einzeltemperierung für die einzelnen Reaktionsproben ausgerüstet ist, können auch völlig willkürliche Anordnungen abweichend vom Zeilen- und Spaltenmuster gewählt werden.

Die Erfindung ist nicht auf Einrichtungen mit zweidimensionaler Anordnung der Reaktionsproben beschränkt. Die Reaktionsproben können auch dreidimensional angeordnet sein, z. B. in einem dreidimensionalen Gitter. Dann lassen sich drei Schritte gleichzeitig hinsichtlich ihrer Temperatur optimieren, die alle drei denselben Auswertparameter beeinflussen. Handelt es sich um einen Temperierungsprozeß, der mehr als drei Schritte aufweist, so können bei zusätzlichen Schritten die bereits verwendeten Richtungen erneut verwendet werden, sofern die Auswertparameter unabhängig sind. Die erwähnte dreidimensionale Anordnung kann bei Einzelheizung der Proben auch, wie am zweidimensionalen Beispiel in den Fig. 5 und 6 erläutert, umsortiert werden. Dabei ist auch eine Anordnung in einer Ebene möglich, auf die die dreidimensionale Anordnung abgebildet ist.

Im Ausführungsbeispiel der Figuren 1 bis 3 ist ein Array von Proben 1 dargestellt, das 5 Zeilen und 7 Spalten ausbildet, also insgesamt 35 Proben aufweist. Um in einem Durchlauf die optimalen Temperaturen für die drei Schritte zu ermitteln, müssen somit 35 teure Proben eingesetzt werden.

Es ist eine Einsparung möglich, indem, wie in den Figuren 1 bis 3 dargestellt, nur eine Spalte und nur eine Zeile mit Proben besetzt wird. In den Figuren 1 bis 3 ist dies durch Unterstreichung der Proben in der 5. Spalte und in der 4. Zeile dargestellt.

Die sich ergebende Kreuzanordnung ermöglicht, die Auswirkung der angelegten Temperaturgradienten sowohl in X-Richtung als auch in Y-Richtung jeweils an einer Reihe von Proben zu ermitteln. Die nicht besetzten Probenplätze können leer bleiben. Die Labortemperatureinrichtung kann auch in Spezialausführung nur zu Zwecken der Temperaturoptimierung ausgebildet sein und dann nur die in den Figuren 1 bis 3 unterstrichen dargestellten Probenplätze aufweisen.

Figur 7 zeigt eine weitere Ausführungsform einer Labortemperiereinrichtung, bei der die Reaktionsproben in einer orthogonal geordneten 3-dimensionalen Anordnung mit sechs Spalten, vier Zeilen und drei Ebenen angeordnet sind. Die drei Ebenen, die tatsächlich übereinander liegen, sind in Figur 7 nebeneinander dargestellt, um die Übersicht zu vereinfachen. An den Plätzen der dargestellten Anordnung sind Reaktionsproben vorgesehen, die in Figur 7 mit dreistelligen Zahlen dargestellt sind. Dabei bedeutet jeweils die erste Ziffer die Spalte, die zweite Ziffer die Zeile und die dritte Ziffer die Ebene. In der in Figur 7 ganz unten liegenden Ebene enden daher alle Zahlen mit 3, weil dies die dritte Ebene ist.

Im Ausführungsbeispiel sind die Proben in einem 3-dimensionalen Block aus wärmeleitfähigem Material angeordnet. Nach aus dem Stand der Technik bekannter Weise können an diesem Block Gradienten in X-Richtung, Y-Richtung oder Z-Richtung angelegt werden. Wird ein Gradient in X-Richtung angelegt, so liegen Proben mit niedriger Spaltenzahl auf niedrigerer und Proben mit höherer Spaltenzahl auf höherer Temperatur. Wird der Gradient in Y-Richtung angelegt, so liegt er quer zu den Zeilen, bringt also diese auf unterschiedliche Temperaturen. Liegt der Gradient in Z-Richtung an, so werden die Ebenen auf unterschiedliche Temperatur gebracht. Dabei liegen jeweils die Zeilen, Spalten oder Ebenen, die quer zum jeweils angelegten Gradienten stehen, auf gleicher Temperatur.

Bei einem Prozeß mit einer dreischrittigen Schrittfolge können mit der dargestellten Labortemperiereinrichtung mit zyklisch wiederholter Schrittfolge, z.B. immer wieder im ersten Schritt ein Gradient in X-Richtung, in jedem zweiten Schritt ein Gradient in Y-Richtung und in jedem dritten Schritt ein Gradient in Z-Richtung angelegt werden.

Die in Figur 7 dargestellt 3-dimensionale Anordnung mit orthogonal geordneter Anordnung der Reaktionsproben zeichnet sich durch gute Übersichtlichkeit aus. Werden die Proben nicht in einen wärmeleitfähigen Block sondern mit Einzelheizung temperiert, so können auch abweichende 3-dimensionale Anordnungen verwendet werden, bei denen die Proben z.B. beliebig vertauscht angeordnet sind, analog zur Vertauschung zwischen den Figuren 5 und 6.

Figur 8 zeigt eine Ausführungsvariante, bei der alle in Figur 7 dargestellten Proben in dem dargestellten flächigen Array angeordnet sind. Man kann erkennen, daß hier die in Figur 7 einzeln dargestellten drei Ebenen nebeneinander in einer Fläche angeordnet sind, und zwar in den ersten sechs Spalten übereinander die obere und mittlere Fläche gemäß Fig. 7 und in der 7 und 8 Spalte die unterste Fläche der Fig. 7 in Umordnung. Mit Einzelheizung der Reaktionsproben oder z.B. geeigneter Unterteilung größerer, nicht dargestellter Heizeinrichtungen können an die Proben der Anordnung gemäß Figur 8 schrittweise dieselben Gradienten angelegt werden, wie zur Ausführungsform der Figur 7 erläutert.

Die Figuren 9 bis 11 zeigen eine weitere Ausführungsform der Labortemperiereinrichtung in drei Schritten einer dreischrittigen Schrittfolge. Dabei zeigt Figur 9 den Annealingschritt, Figur 10 den Elongationsschritt und Figur 11 den Denaturierungsschritt. Die in den Figuren angegebenen Temperaturen entsprechen den zugehörigen Temperaturbereichen, die anhand der Figuren 1 bis 4 bereits erläutert wurden.

In allen drei Figuren 9 bis 11 ist dieselbe flächige Arrayanordnung von Reaktionsproben, jeweils mit Kreisen angedeutet, dargestellt. Im Ausführungsbeispiel sind die Reaktionsproben in sechs Spalten und vier Zeilen in orthogonaler Ausrichtung angeordnet.

Beim Annealingschritt der Figur 9 ist die Arrayfläche mit einer lotrecht stehenden ersten Mittellinie in zwei erste Teilflächen (links bzw. rechts der Mittellinie) unterteilt. In den beiden so gebildeten Teilflächen sind die mit Pfeilen dargestellten Temperaturgradienten angelegt, die zu der mit den Zahlen angegebenen Temperaturverteilung führen. Die rechts und links außen liegenden Spalten liegen auf  $40^{\circ}$ , die nahe der ersten Mittellinie liegenden Spalten liegen auf  $60^{\circ}$ . Es handelt sich also um gleiche Gradienten jedoch mit umgekehrter Richtung.

Beim Elongationsschritt der Figur 10 wird eine entsprechende Temperaturverteilung jedoch innerhalb des für den Elongationsschritt benötigten Temperaturbereiches von  $70^{\circ}$  bis  $76^{\circ}$  angelegt. Hier liegt allerdings die zweite Mittellinie senkrecht zur ersten Mittellinie, also waagrecht. Es sind wiederum gegenläufige gleiche Gradienten in den so gebildeten zweiten Teilflächen angelegt.

Figur 11 zeigt den Denaturierungsschritt. Bei diesem wird in den aus den beiden aus Figur 9 und 10 ersichtlichen Mittellinien gebildeten vier Quadranten jeweils unterschiedliche Temperatur von  $90^{\circ}$  bis  $96^{\circ}$  angelegt, also im Temperaturbereich der für die Denaturierung erforderlich ist.

Betrachtet man die unterstrichen gekennzeichnete Reaktionsprobe die in Spalte 5, Zeile 2 liegt, und verfolgt man diese durch die drei in den Figuren 9, 10 und 11 dargestellten Schritte, so erkennt man, daß diese Probe eindeutig hinsichtlich der optimalen Temperaturen in den drei Schritten identifiziert werden kann. Sie be-

nötigt für den Annealingschritt gemäß Figur 9 etwa 50°, für den Elongationschritt gemäß Figur 10 etwa 75° und für den Denaturierungsschritt gemäß Figur 11 etwa 92°.

Läge die optimale Temperatur bei dem Schritt gemäß Fig. 9 bei 50°, gemäß Fig. 10 bei 75°, gemäß Fig. 11 jedoch anders, und zwar beispielsweise bei 96°, so läge die Probe, für die alle drei Temperaturen optimal sind, in der zweiten Spalte und der dritten Zeile. Es ist zu beachten, daß, wenn in Fig. 9 die optimale Temperatur wie erwähnt bei 50° liegt, dann sowohl in der fünften Zeile als auch in der zweiten Zeile die optimale Temperatur herrscht. Beim gewählten Beispiel der Fig. 10 liegt die optimale Temperatur in der zweiten Zeile und auch in der dritten Zeile.

Es wird nur angemerkt, daß in den Figuren 9 bis 11 eine sehr kleine Arrayfläche mit wenigen Reaktionsproben dargestellt ist, um die zeichnerische Darstellung zu erleichtern. Dadurch ergibt sich beim Elongationsschritt in Figur 10 für die Reaktionsproben nur eine Differenzierung in zwei Temperaturen. Wird die Anzahl der Zeilen und Spalten deutlich erhöht, so lassen sich wesentlich feinere Temperaturunterschiede auswerten.

Wird anstelle der in den Figuren 9 bis 11 dargestellten Arrayfläche mit 24 Proben in sechs Spalten und vier Zeilen die übliche, wesentlich größere Anzahl von 384 Proben in vierundzwanzig Spalten und sechzehn Zeilen verwendet und wird, wie in den Figuren 9 bis 11 dargestellt, mit Teilflächen in Form von Quadranten gearbeitet, so ergeben sich vier Quadranten mit je zwölf Spalten und acht Zeilen. Sollen Temperaturübergangsprobleme im Bereich der Mittellinien zwischen den Quadranten vermieden werden, so können beispielsweise jeweils die beiden den Mittellinien in jedem Quadranten benachbarten Zeilen bzw. Spalten frei gelassen werden. Es verbleiben dann noch in den vier Ecken des Arrays angeordnete, mit

Proben besetzte Bereiche, die jeweils in zehn Spalten und sechs Zeilen sechzig Proben aufnehmen und in denen mit hoher Temperaturauflösung die optimale Temperatur gesucht werden kann.

Wird bei einer solchen Labortemperiereinrichtung mit einem durchgehend wärmeleitfähigen Temperierblock nach Art der Konstruktion gearbeitet, die in der DE 196 46 115 C2 in den Figuren 1 bis 3 dargestellt ist, dann kann der Temperierblock z. B. an seiner den Proben abgewandten Unterseite mit neun Peltierelementen in 3x3 Anordnung großflächig besetzt sein. Dabei liegen in beiden Richtungen die mittleren Peltierelemente unter den Mittellinien und beheizen jeweils vom Rand her zwei benachbarte Quadranten. Mit dieser Anordnung läßt sich in unterschiedlicher Strombeaufschlagung der Peltierelemente abwechselnd die Gradiententemperierung nach Fig. 9 und nach Fig. 10 erzielen. Zur Erzeugung der quadrantenweise unterschiedlichen Beheizung gemäß Fig. 11 könnte die Unterseite des Temperieblockes zusätzlich mit die Quadranten bedeckenden Heizfolien versehen sein, die bei dem Schritt gemäß Fig. 11 und bei ausgeschalteten Peltierelementen die Quadranten einzeln auf die gewünschte Temperatur bringen.

Anders als bei der in den Fig. 9 bis 11 dargestellten Ausführungsform können die Gradienten auch in anderer Weise angelegt werden. Gemäß Darstellung in Fig. 9 werden der rechte obere und der rechte untere Quadrant mit dem selben Gradienten in der selben Richtung beaufschlagt. Der Gradient könnte in diesen beiden Quadranten auch mit entgegengesetzter Richtung angelegt sein. Dasselbe gilt auch für die Quadranten links oben und unten. Es kann z. B. im linken oberen Quadranten der Gradient mit Pfeil nach links und links unten der Gradient mit Pfeil nach rechts angelegt sein. Diese Überlegung gilt auch für die Fig. 10.

Allgemein gilt für diese Ausführungsform, daß in den vier durch die Quadranten gebildeten Teilflächen jeweils im ersten und zweiten Schritt Gradienten in verschiedenen Richtungen angelegt sind und im dritten Schritt (Fig. 11) jeweils alle Proben einer Teilfläche auf gleicher Temperatur liegen. Werden im dritten Schritt nicht, wie in Fig. 11 dargestellt, vier sondern z.B. sechs unterschiedliche Temperaturen benötigt, so sind dementsprechend sechs auf die vorbeschriebene Weise zu behandelnde Teilflächen erforderlich.

In jeder Teilfläche liegt im dritten Schritt eine andere Temperatur an, und werden in den beiden anderen Schritten Gradienten über jede Teilfläche angelegt. Da es für jede Kombination der unterschiedlichen Temperaturen der unterschiedlichen Schritte eine Probe gibt, die mit dieser Temperaturkombination behandelt wurde, werden mit dieser Anordnung auch alle Wechselwirkungen zwischen den Schritten berücksichtigt.



# Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)-40-6562051 Fax: -6567919

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000

Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

12. Dezember 2000

Uns. Zeichen: 02816

Eppendorf AG

Labortemperiereinrichtung zur Temperierung auf unterschiedliche Temperaturen

## PATENTANSPRÜCHE:

1. Labortemperiereinrichtung zur gemeinsamen Temperierung von Reaktionsproben in mindestens zwei Schritten in jeweils zugeordneten bestimmten Temperaturbereichen, welche als Schrittfolge wiederholt nacheinander ausgeführt werden, wobei die Labortemperiereinrichtung in einem beliebig ausgewählten ersten Schritt der Schrittfolge mehrere jeweils wenigstens eine Probe enthaltende erste Gruppen von Proben auf innerhalb der Gruppen gleiche und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen innerhalb des dem ersten Schritt zugeordneten ersten Temperaturbereiches bringt, **dadurch gekennzeichnet**, daß in einem beliebig ausgewählten zweiten Schritt der Schrittfolge, wenn das Reaktionsprodukt bei den beiden Schritten hinsichtlich gleicher Auswertparameter beeinflusst wird, bei mindestens einer der ersten Gruppen wenigstens zwei der Proben verschiedenen zweiten Gruppen angehören, die auf innerhalb der Gruppen gleiche und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen inner-

halb des dem zweiten Schritt zugeordneten zweiten Temperaturbereiches gebracht sind, und wobei, wenn die Auswertparameter unterschiedlich sind, wenigstens zwei beliebige der Proben unterschiedlichen dritten Gruppen angehören, die auf innerhalb der Gruppen gleiche und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen innerhalb des dem zweiten Schritt zugeordneten zweiten Temperaturbereiches gebracht sind.

2. Labortemperiereinrichtungen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei zwei Schritten mit unterschiedlichen Auswertparametern alle Proben einer dritten Gruppe in einer ersten Gruppe enthalten sind oder alle Proben einer ersten Gruppe in einer dritten Gruppe enthalten sind.
3. Labortemperiereinrichtungen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei zwei Schritten mit gleichen Auswertparametern bei allen zweiten Gruppen jeweils alle Proben unterschiedlichen ersten Gruppen angehören.
4. Labortemperiereinrichtungen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Proben in einem Array in Zeilen und Spalten angeordnet sind.
5. Labortemperiereinrichtungen nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zeilen und Spalten orthogonal zueinander angeordnet sind.
6. Labortemperiereinrichtungen nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß alle Proben einer Gruppe in einer Zeile oder in einer Spalte liegen.
7. Labortemperiereinrichtungen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß nur je eine der ersten und/oder zweiten und/oder dritten Gruppen mehrere Proben enthalten.

8. Labortemperiereinrichtungen nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die mehrere Proben enthaltenden Gruppen Proben derjenigen anderen Gruppen enthalten, die in ihrem jeweils zugeordneten Temperaturbereich in der Nähe der mittleren Temperatur liegen.
9. Labortemperiereinrichtungen nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die dritten Gruppen Teilbereiche des Arrays ausbilden, welche mit ihren Bereichsgrenzen nur jeweils Proben derselben dritten Gruppe umschließen.
10. Labortemperiereinrichtungen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei allen Schritten der Schrittfolge die Proben auf gruppenweise unterschiedliche Temperaturen im Bereich des zugeordneten Temperaturbereiches gebracht sind.
11. Labortemperiereinrichtung zur gemeinsamen Temperierung von Reaktionsproben in mindestens drei Schritten in jeweils zugeordneten bestimmten Temperaturbereichen, welche als Schrittfolge wiederholt nacheinander ausgeführt werden, wobei die Labortemperiereinrichtung in einem beliebig ausgewählten ersten Schritt der Schrittfolge mehrere jeweils wenigstens eine Probe enthaltende erste Gruppen von Proben auf innerhalb der Gruppen gleiche und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen innerhalb des dem ersten Schritt zugeordneten ersten Temperaturbereiches bringt, und wobei in einem beliebig ausgewählten zweiten Schritt der Schrittfolge bei mindestens einer der ersten Gruppen wenigstens zwei Proben verschiedenen zweiten Gruppen angehören, die auf innerhalb der Gruppen gleiche und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen des dem zweiten Schritt zugeordneten zweiten Temperaturbereiches gebracht werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß in einem beliebig ausge-

wählten dritten Schritt der Schrittfolge bei mindestens einer der ersten Gruppen und mindestens einer der zweiten Gruppen wenigstens jeweils zwei Proben verschiedenen dritten Gruppen angehören, die auf innerhalb der Gruppen gleiche und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen innerhalb des dem dritten Schritt zugeordneten dritten Temperaturbereiches gebracht werden.

12. Labortemperiereinrichtung nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reaktionsproben 3-dimensional angeordnet sind und zur Erzeugung der unterschiedlichen Temperaturen für drei Schritte Temperaturgradienten in X-, Y- und Z-Richtung angelegt werden.
13. Labortemperiereinrichtung nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reaktionsproben in einer Fläche angeordnet sind.
14. Labortemperiereinrichtung nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß in dem ersten Schritt die Fläche mit einer ersten Mittellinie in zwei erste Teilflächen geteilt ist, in denen jeweils gleiche Temperaturgradienten mit entgegengesetzter Richtung senkrecht zur Mittellinie angelegt sind, und daß in dem zweiten Schritt die Fläche mit einer zweiten Mittellinie, die senkrecht zur ersten Mittellinie steht, in zwei zweite Teilflächen geteilt ist, in denen jeweils gleiche Temperaturgradienten mit entgegengesetzter Richtung senkrecht zur Mittellinie angelegt sind, und daß in dem dritten Schritt in den durch die beiden Mittellinien gebildeten vier Quadranten der Fläche unterschiedliche Temperaturen angelegt sind.

# Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)-40-6562051 Fax: -6567919

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000

Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

12. Dezember 2000

## ZUSAMMENFASSUNG

Eine Labortemperiereinrichtung zur gemeinsamen Temperierung von Reaktionsproben in mindestens zwei Schritten in jeweils zugeordneten bestimmten Temperaturbereichen, welche als Schrittfolge wiederholt nacheinander ausgeführt werden, wobei die Labortemperiereinrichtung in einem beliebig ausgewählten ersten Schritt der Schrittfolge mehrere jeweils wenigstens eine Probe enthaltende erste Gruppen von Proben auf innerhalb der Gruppen gleiche und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen innerhalb des dem ersten Schritt zugeordneten ersten Temperaturbereiches bringt, ist dadurch gekennzeichnet, daß in einem beliebig ausgewählten zweiten Schritt der Schrittfolge, wenn das Reaktionsprodukt bei den beiden Schritten hinsichtlich gleicher Auswertparameter beeinflusst wird, bei mindestens einer der ersten Gruppen wenigstens zwei der Proben verschiedenen zweiten Gruppen angehören, die auf innerhalb der Gruppen gleiche und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen innerhalb des dem zweiten Schritt zugeordneten zweiten Temperaturbereiches gebracht sind, und wobei, wenn die Auswertparameter unterschiedlich sind, wenigstens zwei beliebige der Proben unterschiedlichen dritten Gruppen angehören, die auf innerhalb der Gruppen gleiche und zwischen den Gruppen unterschiedliche Temperaturen innerhalb des dem zweiten Schritt zugeordneten zweiten Temperaturbereiches gebracht sind.